

グルコサミンの摂取がマウス長管骨の骨密度に与える影響

Oral Administration of N-acetyl glucosamine Affects Bone Mineral Density in C57BL/6J Mice

中谷祥恵*, 清水達夫, 古旗賢二, 和田政裕

Sachie NAKATANI*, Tatsuo SHIMIZU, Kenji KOBATA, Masahiro WADA

要旨

目的: D-グルコサミン塩酸塩 (以下, GlcN) および N-アセチル-D-グルコサミン (以下, GlcNAc) の摂取が, マウス脛骨の骨形成および骨吸収に与える影響を明らかにすることを目的として実験を行った。

方法: 実験動物には, C57BL/6J 雄性マウス 10 週齢を用いた。グルコース含有飼料群 (コントロール群), GlcN 含有飼料群 (GlcN 群), GlcNAc 含有飼料群 (GlcNAc 群) の 3 群 ($n=7$) に分け, 3 週間飼育を行った。飼育終了後, 大腿骨と脛骨を摘出した。大腿骨は 70% エタノールで固定し, 骨密度測定に用いた。脛骨は 4% パラホルムアルデヒドで固定し, パラフィン包埋切片作製に用いた。切片作製後, 骨形態計測を行った。

結果: pQCT 法で骨密度を測定した結果, 一次海綿骨密度はコントロール群 $517.6 \pm 6.8 \text{ mg/cm}^3$, GlcN 群 $525.9 \pm 10.3 \text{ mg/cm}^3$, GlcNAc 群 $553.4 \pm 8.3 \text{ mg/cm}^3$ だった。骨形態計測の結果, 骨形成パラメータである骨梁周囲長当たりの骨芽細胞数 (N.Ob/B.Pm) の値は, コントロール群 $244.3 \pm 53.5 /100\text{mm}$, GlcN 群 $321.5 \pm 103.7 /100\text{mm}$, GlcNAc 群 $302.7 \pm 70.2 /100\text{mm}$ だった。骨吸収パラメータである骨梁周囲長当たりの破骨細胞数 (N.Oc/B.Pm) の値は, コントロール群 $132.3 \pm 48.0 /100\text{mm}$, GlcN 群 $113.2 \pm 29.3 /100\text{mm}$, GlcNAc 群 $114.0 \pm 45.5 /100\text{mm}$ だった。

考察: GlcNAc の摂取は, 通常マウスの骨密度を増加させた。また, 骨形態計測の結果から, GlcN および GlcNAc の摂取は骨形成を促進し, GlcNAc の摂取は骨吸収を抑制する可能性が示唆された。GlcNAc 摂取は骨吸収の調節を介して骨密度を増加させる可能性が示唆された。

グルコサミン研究 7: 51-56, 2011

keywords

N-アセチルグルコサミン (GlcNAc), グルコサミン塩酸塩 (GlcN), 骨密度, 骨形態計測

はじめに

骨粗鬆症は, 骨密度の低下と骨質の劣化により骨強度が低下し, 骨折が起きやすくなる疾患である。骨粗鬆症は, 加齢とともに罹患者が増加する疾患であり, 高齢社会を迎えた日本では, 骨粗鬆症の予防が重要であると考えられている。

D-グルコサミン塩酸塩 (以下, GlcN) および N-

アセチル-D-グルコサミン (以下, GlcNAc) は細胞外基質を構成するグリコサミノグリカン (GAG) の基本構成糖である。現在, GlcN および GlcNAc は関節機能の改善を目的に健康食品として摂取されている。細胞外に存在する GlcN は, グルコーストランスポーター 2 (GLUT2) を介して細胞内に取り込まれ, GlcNAc を経由後, ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などの GAG になることがすでに報告されてい

る^{1,2)}。したがって、GlcN および GlcNAc の摂取は関節軟骨の GAG を増加させることが期待されている。

さらに、GlcN の摂取が骨代謝に関与する可能性が報告されている。靱帯損傷型変形性関節症モデルウサギを用いた実験において、GlcN を摂取させたウサギは関節軟骨の損傷が減少するのに加え、軟骨下骨の骨密度を増加させることが報告されている³⁾。われわれも閉経後骨粗鬆症マウスを用いた実験において、GlcN の摂取がマウスの骨密度を増加させることを報告している⁴⁾。この結果は、GlcN の摂取が、軟骨代謝と骨代謝の双方を調節する可能性を示している。しかし、GlcNAc が骨代謝を調節する可能性はほとんど報告されていない。

最近の研究では、GlcN および GlcNAc がタンパク質の翻訳後修飾などに関与することで、さまざまなシグナル伝達を調節することが示唆されている^{5,6)}。たとえば、GlcN が p38MAPK のリン酸化を抑制することが滑膜細胞を用いた実験で報告されている⁷⁾。われわれも前駆軟骨細胞株を用いた実験で、GlcN が Smad 2 などの mRNA 発現レベルの調節を介して軟骨細胞の石灰化を抑制する可能性を報告した^{8,9)}。

また、マウスに GlcN および GlcNAc を摂取させ、DNA マイクロアレイを用いて肝臓のトランスクリプトーム解析を行った¹⁰⁾。その結果、GlcN および GlcNAc は肝臓の複数の mRNA 発現レベルを調節する可能性を見出した。

これらの結果は、GlcN および GlcNAc が関節軟骨以外の代謝にも遺伝子発現調節を介しはたらく可能性があることを示唆している。したがって、GlcN および GlcNAc が骨の構成細胞である骨芽細胞および破骨細胞の機能を調節し、骨密度を調節する可能性があるといえる。

そこで本実験では、まず、通常マウスに約 25mg/kg/日の GlcN および GlcNAc を摂取させ、マウスの骨密度に影響を与える可能性を検討することを目的とする。約 25mg/kg/日の摂取量は、ヒトが関節機能障害の改善を目的に健康食品として摂取している GlcN 摂取量と同等量で、同 GlcNAc 摂取量の約 3 倍の量である。

本実験では、関節機能障害の改善を目的に摂取した GlcN および GlcNAc が骨機能も調節する可能性を検討する。また、GlcN の摂取が骨密度を増加させる可能性は示唆されているが、GlcNAc の摂取が骨密度を増加させる可能性はあまり検討されていない。そこで、GlcNAc の摂取が骨密度を増加させる可能性を検討す

ることも目的とする。

さらに骨形態計測を行い、摂取した GlcN および GlcNAc が骨形成と骨吸収に与える影響を検討し、GlcN および GlcNAc の骨代謝調節機能の作用部位を明らかにすることを目的とする。

I. 材料および方法

1 実験動物

実験動物は 9 週齢の C57BL/6J 雄性マウス（日本クレア）を用いた。1 週間の予備飼育後、これらをグルコース含有飼料群（コントロール群）、グルコサミン塩酸塩含有飼料群（GlcN 群）、N-アセチルグルコサミン含有飼料群（GlcNAc 群）の 3 群（それぞれ $n=7$ ）にランダムに分け、3 週間飼育を行った。

飼料は AIN-93G 組成を基準とし、GlcN および GlcNAc は 0.02g/100g をコーンスターチと置き換えた。飼料中のグルコース、GlcN および GlcNAc はシグマ-アルドリッチ社の 99% 以上の純度の製品を用いた。飼料および水は自由摂取とした。飼育環境は、温度を 20～22℃、湿度を 45～50%、12 時間明暗周期の環境とした。飼育終了後、ペントバルビタール麻酔下で大腿骨、脛骨を採取した。本実験は城西大学動物実験管理委員会の認証を得て実施された。

2 骨密度測定

大腿骨の骨密度は、実験動物用 X 線 CT 装置（LCT-100Lite・ALOKA）を用い pQCT（peripheral quantitative computed tomography）法で測定した。一次海綿骨密度は、大腿骨遠位骨端部から 1,000～1,010 μ m の部位を測定した。皮質骨密度は、大腿骨遠位骨端部から 2,500～2,510 μ m の部位を測定した。

3 骨形態計測

左足脛骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液（pH 7.2）中に 4℃で一晩固定を行った。その後、パラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色を行った。

骨形態計測は、作製した切片を半自動解析装置であるオステオメジャー（Osteo Metrics 社製）を用いて行った。測定部位は成長板軟骨から遠位部方向に 0.25 μ m、皮質骨から内側方向に 1.125 μ m の場所

を測定した。骨形態計測は、単位骨梁 [bone volume per tissue volume, BV/TV (%)], 骨梁厚 [trabecular thickness, Tb.Th (μm)], 骨梁数 [trabecular numbers (/mm), Tb.N], 骨梁間隙 [trabecular spacing, Tb.Sp (μm)], 骨梁周囲長当たりの骨芽細胞付着面長 [osteoblast surface per bone surface, Ob.s/BS (%)], 骨梁周囲長当たりの骨芽細胞数 [osteoblast number per bone perimeter, N.Ob/B.pm (/100mm)], 骨梁周囲長当たりの骨吸収面長 (eroded surface number per bone surface, ES/BS), 骨梁周囲長当たりの破骨細胞付着面長 (osteoclast surface per bone surface, Oc.s/BS), 骨梁周囲長当たりの破骨細胞数 [osteoclast number per bone perimeter, N.Oc/B.pm (/100mm)] を測定した。

II. 結果

1 体重および飼料摂取量

マウスの最終体重と体重増加量は、各群に有意な差はなかった (データ未発表)。また、飼育期間中の飼料摂取量も各群に有意な差はなかった (データ未発表)。

2 骨密度

表1にpQCT法の結果を示した。一次海綿骨密度は、コントロール群は $517.6 \pm 6.8 \text{ mg/cm}^3$, GlcN群は $525.9 \pm 10.3 \text{ mg/cm}^3$, GlcNAc群は $553.4 \pm 8.3 \text{ mg/cm}^3$ だった。GlcNAc群はコントロール群と比較して、一次海綿骨密度が有意に増加した。

皮質骨密度は、コントロール群は $648.3 \pm 4.8 \text{ mg/cm}^3$, GlcN群は $654.2 \pm 2.8 \text{ mg/cm}^3$, GlcNAc群は $673.6 \pm 5.3 \text{ mg/cm}^3$ だった。GlcNAc群はコントロール群と比較して有意に皮質骨密度が増加した。一方、GlcN群の骨密度は海綿骨密度および皮質骨密度とも

にコントロール群と比較して有意な差がなかった。

3 骨形態計測

骨形態計測は、各群5本の脛骨を用いて行った。骨梁の長さや太さに関する骨形態計測結果を図1に示した。BV/TV, Tb.Th, Tb.Nの値は、GlcNAc群がコントロール群と比較して増加傾向だった。Tb.Spの値は、GlcNAc群がC群と比較して減少傾向だった。次に骨芽細胞に関する形態計測結果を図2に示した。Ob.s/BS (%) と N.Ob/B.pm の2つのパラメータを比較した結果、GlcN群とGlcNAc群はコントロール群と比較して増加傾向だった。また、Ob.s/BS (%) と N.Ob/B.pm の値は、GlcN群はGlcNAc群と比較して高値を示した。破骨細胞に関する形態計測結果を図3に示した。ES/BS, Oc.s/BS, N.Oc/B.pmの3つのパラメータを比較した結果、ES/BSとN.Oc/B.pmの値は、GlcN群とGlcNAc群はコントロール群と比較して減少傾向だった。また、ES/BSの値は、GlcNAc群はGlcN群と比較して低値を示した。一方、Oc.s/BSの値は3群間に差はなかった。

III. 考察

本実験の結果、GlcNAcの摂取は通常マウスの骨密度を増加させることが明らかとなった。以前、われわれは卵巣摘出した閉経後骨粗鬆症モデルマウスにGlcNを約6mg/匹/日となるように4週間摂取させたときに、pQCT法で測定した全骨密度が有意に増加することを報告した⁴⁾。本実験では、通常マウスにGlcNおよびGlcNAcを約0.25mg/g/日となるように3週間摂取させた。その結果、本実験の摂取期間および摂取量において、GlcNの摂取はマウスの骨密度に影響を与えなかったが、GlcNAcの摂取はマウスの骨密度を増加させる (表1)。

骨形態計測を実施して、GlcNおよびGlcNAcの摂

表1 GlcNおよびGlcNAcの摂取がマウス大腿骨の骨密度に与えた影響

	コントロール群	GlcN群	GlcNAc群
海綿骨密度 (mg/cm^3)	517.6 ± 6.8	525.9 ± 10.3	$553.4 \pm 8.3^*$
皮質骨密度 (mg/cm^3)	648.3 ± 4.8	654.2 ± 2.8	$673.6 \pm 5.3^*$

各群7匹のマウスを用いた。

Mean \pm SD. * $p < 0.05$ (Dunnet's t test vs コントロール)

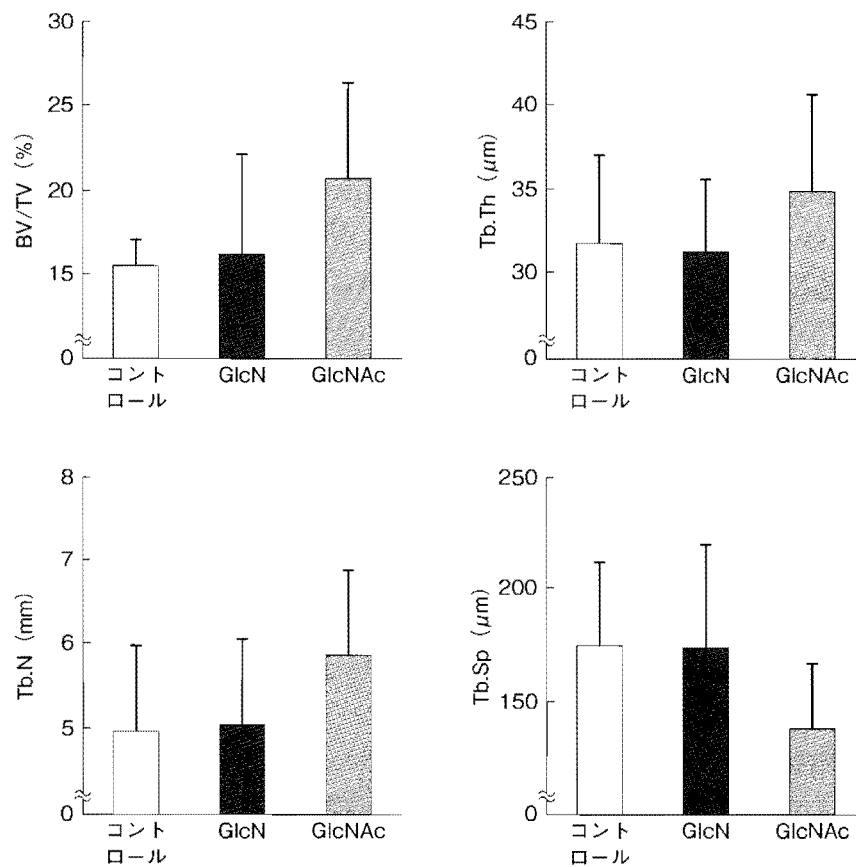


図 1 GlcN および GlcNAc の摂取がマウス脛骨の骨形態計測パラメータに与えた影響

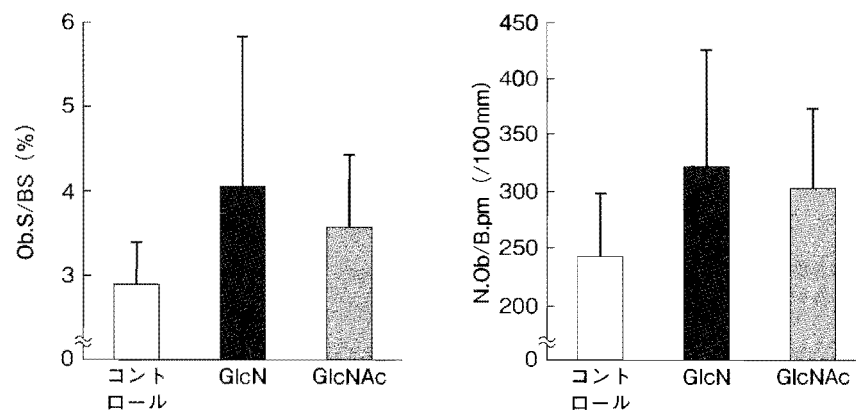


図 2 GlcN および GlcNAc の摂取がマウス脛骨の骨芽細胞パラメータに与えた影響

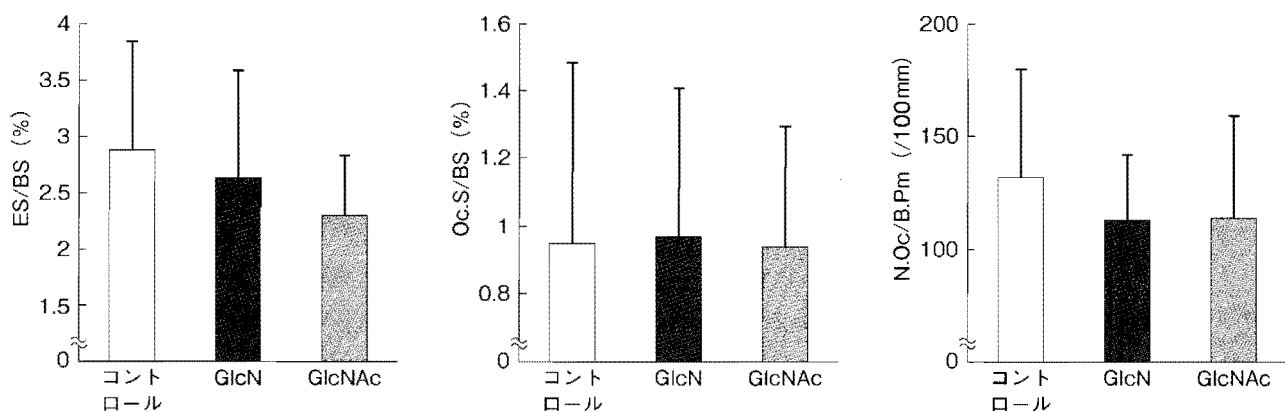


図 3 GlcN および GlcNAc の摂取がマウス脛骨の破骨細胞パラメータに与えた影響

取がマウスの骨梁や骨芽細胞および破骨細胞に与える影響を検討した。BV/TV の値は GlcNAc 摂取群がコントロール群と比較して増加し、Tb.Sp の値は GlcNAc 群がコントロール群と比較して低下した結果から、GlcNAc は骨に占める海綿骨の骨梁の割合を高くし、骨梁間隙を狭くしたことが明らかになった(図 1)。この結果は、GlcNAc の摂取が海綿骨密度を増加させた結果と一致する。Tb.Th と Tb.N の値は、GlcNAc の摂取によりコントロール群と比較して増加傾向を示したため、GlcNAc はマウス海綿骨の骨梁厚を太くし、骨梁数を増加させる可能性が示唆された。

そこで、次に骨梁に付着する骨芽細胞および破骨細胞に関するパラメータを比較し、GlcNAc が骨形成と骨吸収のどちらに影響を与える可能性があるか検討した。骨芽細胞に関するパラメータを比較した結果、GlcN と GlcNAc の摂取はともにコントロール群と比較して Ob.s/BS と N.Ob/B.pm の値を増加させた(図 2)。したがって、GlcN と GlcNAc の摂取は骨芽細胞数を増加させ、骨形成を促進させる可能性が示唆された。

また、Ob.s/BS と N.Ob/B.pm の値は GlcNAc と比較して GlcN が高かった。したがって以前われわれが報告した高容量の GlcN 摂取による骨密度増加作用は、GlcN が骨形成を促進した結果の可能性も考えられた。

破骨細胞に関するパラメータを比較した結果、破骨細胞数が GlcN と GlcNAc の摂取で減少し、骨吸収面も減少していることが明らかになった。また、ES/BS の値において、GlcNAc 群は GlcN 群と比較して低値を示したため、GlcNAc は GlcN と比較して骨吸収抑制作用が高い可能性が示唆された。

本実験において、pQCT 法を用いた骨密度測定で GlcNAc の摂取はマウス海綿骨密度を有意に増加させた。しかし、骨形態計測の結果は、骨密度の結果を支持するものであったが、有意な差は得られなかった。したがって、GlcNAc の骨密度増加作用について、今後、閉経後骨粗鬆症モデルマウスやカルシウム欠乏モデルマウスなどの骨粗鬆症モデルマウスを用いて詳細に検討する必要がある。また、培養骨芽細胞および破骨細胞などを用いて GlcN や GlcNAc が骨芽細胞および破骨細胞に与える影響およびその作用メカニズムを検討する必要がある。

本稿で紹介した GlcNAc の骨密度増加作用はマウスで示された結果であるため、ヒトに GlcNAc を摂取させたときに骨代謝に与える影響については不明である。本研究の GlcNAc 摂取量は約 0.025mg/g/日であ

り、OA 患者への投与量と同程度である。今後、ヒトが GlcNAc を摂取した際に骨密度を増加させることが明らかになれば、骨粗鬆症と OA の双方に有効である初めての成分となる可能性がある。また、GlcNAc と GlcN の作用が異なることが、われわれも含めた複数の研究グループが報告している¹⁰⁻¹²⁾。したがって、GlcNAc と GlcN の併用摂取が、骨粗鬆症と OA に与える影響を検討する試験が望まれる。

謝 辞

本研究は、生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われた。

◆参考文献

- 1) Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B: GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 135 : 199-203, 2002
- 2) Anderson JW, Nicolosi RJ, Borzelleca JF : Glucosamine effects in humans : a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food Chem Toxicol* 43 : 187-201, 2005
- 3) Wang SX, Laverty S, Dumitriu M, Plaas A, Grynias MD : The effects of glucosamine hydrochloride on subchondral bone changes in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 56 : 1537-1548, 2007
- 4) 山崎恭枝, 真野 博, 中谷祥恵, 和田政裕 : グルコサミン塩酸塩がマウス硬組織に与える影響. *グルコサミン研究* 3 : 1-6, 2007
- 5) Kudlow, J.E : Post-translational modification by O-GlcNAc : another way to change protein function. *J Cell Biochem* 98 : 1062-1075, 2006
- 6) Mishra S, Ande SR, Salter NW : O-GlcNAc modification : why so intimately associated with phosphorylation? *Cell Commun Signal* 9 : 1, 2011
- 7) Hua J, Sakamoto K, Kikukawa T, Abe C, Kurosawa H, Nagaoka I : Evaluation of the suppressive actions of glucosamine on the interleukin-1beta-mediated activation of synoviocytes. *Inflamm Res* 56 : 432-438, 2007
- 8) Nakatani S, Mano H, Im R, Shimizu J, Wada M : Glucosamine regulates differentiation of a chondrogenic cell line, ATDC5. *Biol Pharm Bull* 30 : 433-438, 2007
- 9) 中谷祥恵, 真野 博, 清水 純, 任 良赫, 和田政裕 : グルコサミン塩酸塩およびグルコサミン類似糖が軟骨細胞株 ATDC5 に及ぼす影響. *グルコサミン研究* 2 : 8-14, 2006
- 10) 中谷祥恵, 真野 博, 古旗賢二, 和田政裕 : DNA マイクロアレイ法を用いたグルコサミン塩酸塩および N-アセチルグルコサミン摂取におけるマウス肝臓の遺伝子発現解析. *グルコサミン研究* 4 : 1-8, 2008

11) 五十嵐 庸, 加賀出穂, 華 見, 高森吉守, 坂本廣司, 宮澤敬治, 長岡 功: ヒト滑膜細胞および軟骨細胞におけるグリコサミノグリカン産生に対するアミノ糖およびウロン酸の効果. グルコサミン研究 5 : 55-60, 2009

12) 五十嵐 庸, 加賀出穂, 華 見, 高森吉守, 坂本廣司, 宮澤敬治, 長岡 功: ヒト滑膜細胞および軟骨細胞におけるグリコサミノグリカン産生に対するアミノ糖およびウロン酸の効果—第二報. グルコサミン研究 6 : 68-71, 2010